

Kongenitt hypertyreose

En årsaksgjennomgang og pilotstudie om effekten av indusert hypertyreose
på mitoserate og apoptoserate i kornceller i lillehjerne på kyllingfoster

Marianne Solheim Sandberg

Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo

Mars 2011

Veiledere:

Jan Mæhlen

Overlege og professor 2

Patologisk anatomisk avdeling, Oslo Universitetssykehus Ullevål

Petra Aden

Stipendiat og barnenevrolog

Patologisk anatomisk avdeling, Oslo Universitetssykehus Ullevål

Innhold

Abstract	3
Innledning	4
Teoretisk del	4
Tyreoidea	4
Anatomi	4
Utvikling	4
Tyreoideahormonenes fysiologi og virkning	5
Tyreoideahormonene og svangerskapet	8
Hypertyreose	9
Maternell hypertyreose	10
Årsaker til maternell hypertyreose	10
Kongenitt hypertyreose	11
Årsaker til kongenitt hypertyreose	11
Symptomer ved kongenitt hypertyreose	12
Behandling av kongenitt hypertyreose	13
Cerebellum	13
Anatomi	13
Funksjon	16
Utvikling av cerebellum	17
Cellemitotose, proliferasjon og apoptose som del av cerebellums utvikling	18
Tyreoideahormoner og sentralnervesystemet i utvikling	19
Eksperimentell del – Kylling som modellsystem	19
Innføring	19
Metode	20
Kvantifisering av proliferasjon	21
Kvantifisering av apoptose	22
Resultater	23
Metodeutprøving	23
Proliferasjon	24
Apoptose	25
Diskusjon	26

Abstract

Congenital hyperthyroidism is found to occur in 1 : 4 000 – 1 : 40 000 newborn. The disease can be divided in two groups, autoimmune congenital hyperthyroidism and non-autoimmune congenital hyperthyroidism. In the first group the mothers of the children most often have Graves disease, and the infant's disease is transient, as the antibodies disappears from the child's circulation in the first 6 months. In the latter group are mutations of the thyroid receptor the cause, and the hyperthyroidism is persistent.

Children with congenital hyperthyroidism show more often reduced psycho-motoric skills than healthy children. Thyroid hormone (TH) is found to be important for the development of the cerebellum. Early in development of the nervous system TH balance is assumed to be important because the presence of TH and TH-regulating molecules in nervous tissue. In the postnatal period the migration of neurons in the cerebellum is affected by excess TH in the circulation and brain tissue. To reduce the impact of the disease it is advised to treat mothers with maternal hyperthyroidism.

Pregnant women can have transient hyperthyroidism due to increase in hCG-levels above normal. Although this may result in fetal hyperthyroidism early in pregnancy, the condition is not associated with negative pregnancy outcome.

To study the influence of TH on basic mechanisms such as neuronal proliferation and apoptosis, chicken embryos were injected with increasing doses of thyroxine at day 16 in a pilot study. After 24 hours incubation the chicken embryos was decapitated.

The pilot study shows increased rates of apoptosis and mitosis in IGL in cerebellum of hyperthyroid chicken embryos.

Kongenitt hypertyreose

En årsaksgjennomgang og pilotstudie om effekten av induisert hypertyreose på mitoserate og apoptoserate i kornceller i lillehjerne på kyllingfoster.

Innledning

Kongenitt hypertyreose forekommer i 1 av 4000 til 1 av 40 000 levendefødte (1). Siden det er en sjelden tilstand, er studier med fokus på hypertyreose og sentralnervesystemets utvikling hos fostre i fåtall. Det er derimot velkjent at hypertyreose hos voksne kan gi kognitive problemer, psykiatriske symptomer og perifer nevropati (2). Graves sykdom er den vanligste årsaken til hypertyreose hos kvinner i fruktbar alder, og kan gi fostre en hypertyreot tilstand. Ifølge Krassas, Poppe og Glinioer (2010) angis prevalensen av klinisk hypertyreose hos gravide å være mellom 0,1 til 1 % (3). Dermed er det en aktuell problemstilling å undersøke tyreksinhormonets virkning på det umodne nervesystemet.

Denne oppgaven er delt inn i en teoretisk og eksperimentell del. I den teoretiske delen presenteres teori rundt utviklingen av tyreoida og lillehjernen. I tillegg til kongenitt hypertyreose er de vanligste tyreoidesykdommene som kan ramme kvinner i fruktbar alder omtalt, med fokus på hypertyreose under svangerskap. I den eksperimentelle delen presenteres en pilotstudie på virkningen av induisert hypertyreose på apoptoserate og mitoserate i kornceller i lillehjerne hos kyllingfoster.

Teoretisk del

Tyreoida

Tyreoida, skjoldbruskkjertelen, produserer tyreoidahormonene (TH) som virker på cellemetabolismen perifert i ulike vev i kroppen.

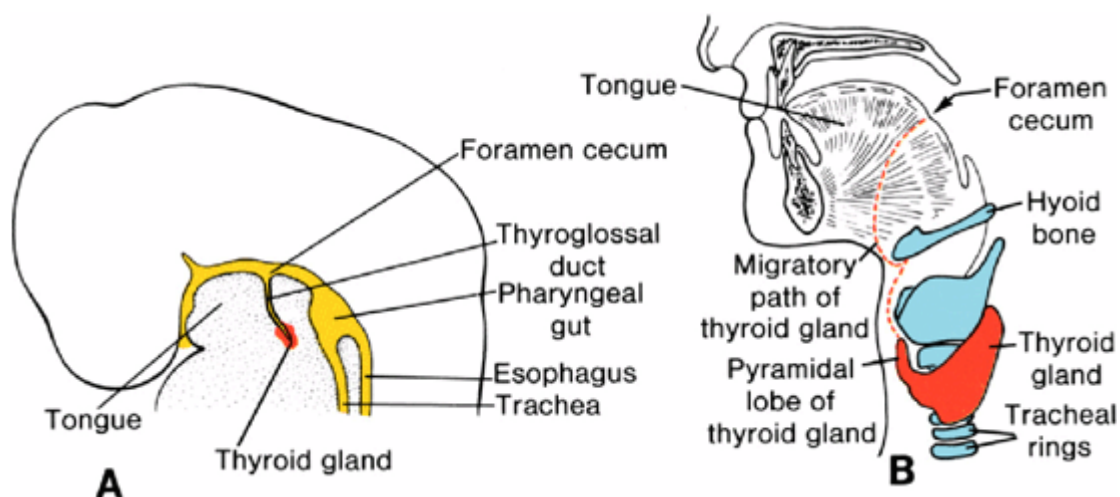
Anatomi

Tyreoida ligger foran trakea i nivå med ryggvirvlene C5-T1, og er den eneste endokrine kjertelen som kan sees og palperes. Hos voksne veier den ca 20 gram og er kroppens største endokrine kjertel. Den er delt opp i en høyre og venstre lapp, som er forbundet med isthmus (4).

Hormondannelsen krever essensiell tilførsel av jod, og hormonet lagres ekstracellulært i kjertelens kolloid, ferdigsyntetisert bundet til glykoproteinet tyreoglobulin, som utgjør det meste av kolloidet. Kolloidet er omringet av follikkelcellene som syntetiserer TH (5).

Utvikling

I fjerde gestasjonsuke starter utviklingen av tyreoidakjertelen med celleprolifisering av det endodermale gulvet av embryonale farynx, nær foramen coecum på tungebasis. Samtidig som den utvikles vandrer tyreoida nedover, foran tungebænet og skjoldbrusken, før kjertelen ender på forsiden av trakea like under ringbrusken, i syvende uke (Fig. 1) (5;6).

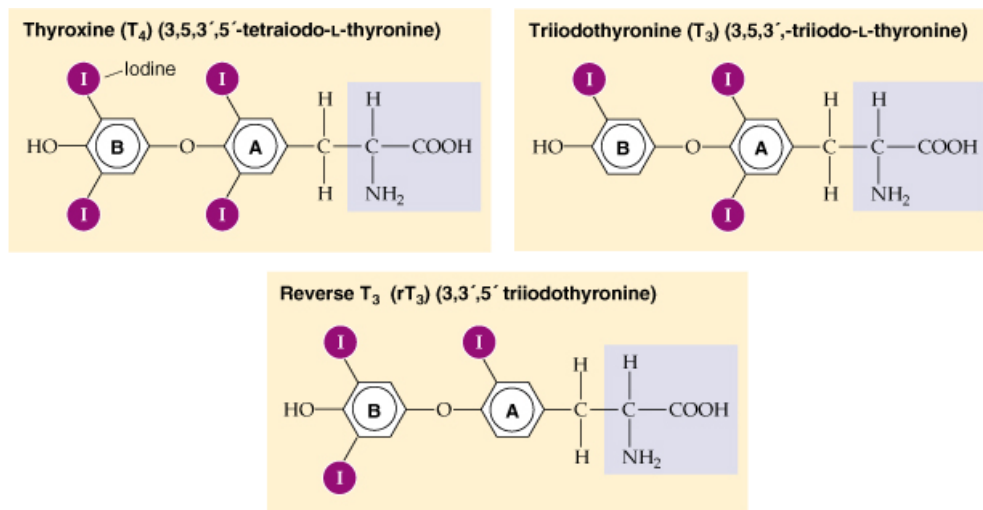


Figur 1 Tyreoideas vandring fra tungebasis til like under ringbrusken. Fra (6).

Ved 12 ukers alder konsentrerer fosterets tyreoidea jod i mye større grad enn den materielle tyreoidea (7). Syntese og utskillelse av TH kommer da i gang, og follikler inneholdende kolloid er tilstede (6). Samtidig uttrykkes TSH (tyreoidastimulerende hormon)-reseptor på overflaten av tyreoideas follikkelceller, og det er sannsynlig at kjertelen allerede da påvirkes av TSH (8). Føtalt TSH, tyroksin, og tyreoidbindende globulin (TBG) er funnet i føtalt serum ved 11 uker. Den føtale hypofysen blir sensitiv for feedback av tyreoideahormonene senere i fosterutviklingen (9).

Tyreoideahormonenes fysiologi og virkning

Tyreoideahormonene regulerer metabolismen i cellene og virker via nukleære reseptorer ved å regulere gentranskripsjon (10). Det finnes også ikke-genetiske virkningsmekanismer for tyreoideahormonet og –reseptoren (THR) (11). Tyroksin (T4) og trijodtyronin (T3) er de to aktive hormonene. T3 har høyere affinitet for tyreoideareseptorene enn T4 og er dermed det biologisk mest aktive hormonet av de to. Tyreoidea produserer mest T4 (90 %), men T4 omdannes til T3 eller revers T3 (rT3) i vev. I motsetning til T3, som har to jodatomer i sin indre benzyllring, har rT3 to jodatomer i sin ytre benzyllring (Fig. 2). rT3 har ingen kjente funksjoner, men er viktig i reguleringen av stoffskiftet på cellenivå (10).



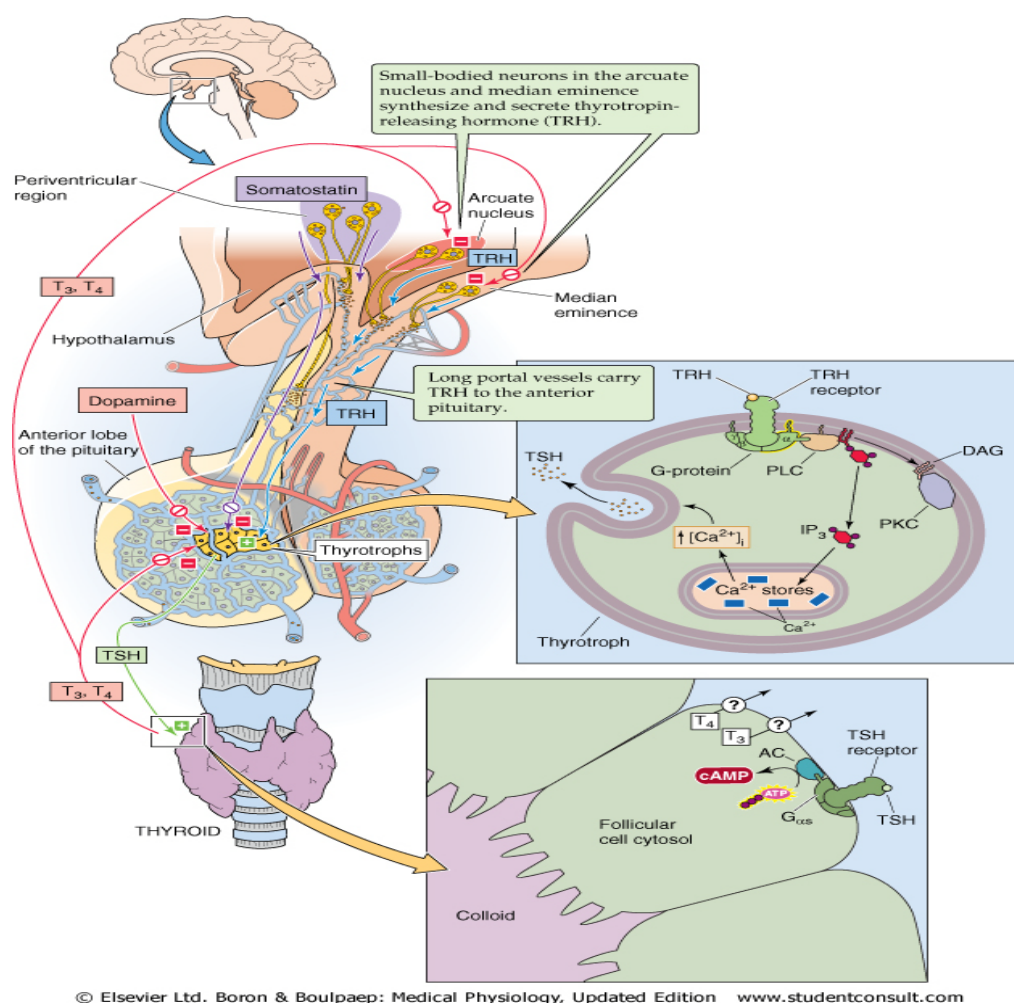
Figur 2 Tyreoideahormonenes struktur. Redigert figur fra (10).

Over 99.98 % av T₄, og rundt 99.5 % av T₃, er bundet til plasmaproteiner som TBG, albumin og transthyretin i blodet. De frie, ubundne hormonene er ansvarlige for virkningen av TH på målorganet. TBG produseres av leveren, og mengden av TBG i sirkulasjonen endres i ulike fysiologiske settinger. Graviditet, orale østrogener, hepatitt og kronisk heroinmisbruk kan heve TBG-nivået, og dermed heves den totale konsentrasjonen av T₄ og T₃. Steroidbruk og nefrotisk syndrom kan senke TBG-nivået, og totalkonsentrasjonen av T₄ og T₃ senkes. Ved endringer av TBG-nivåer vil likevel fritt T₄ (fT₄) og fritt T₃ (fT₃) forbli uendret. Hormoner bundet til plasmaproteinene utgjør et lager av TH i sirkulasjonen. I tillegg forlenges hormonenes halveringstid. T₄ har en halveringstid på 8 dager når det er bundet til et plasmaprotein, T₃ har en halveringstid på ca 24 timer.

Nivået av TH i blodet reguleres av et feedbacksystem (se Fig. 3), der syntese og utskillelse av T₄ og T₃ fra tyreoidea er regulert av tyreoideastimulerende hormon (TSH), som skilles ut av tyrotrofene, en liten cellegruppe i adenohypofysen. Tyreotropinfrigjørende hormon (TRH) som frigjøres av nevronene i nucleus arcuatus og eminentia mediana i hypothalamus transporteres via det hypofyseale portvenesystemet til hypofysen, og stimulerer tyrotrofene i adenohypofysen til å syntetisere og frigjøre TSH via G-protein-koblede TRH-reseptorer.

Glykoproteinet TSH er satt sammen av α - og β -kjeder. β -kjeden er unik for TSH, men strukturen til α -kjeden er identisk til de andre glykoprotein-hormonene LH, FSH og hCG. TSH virker via TSH-reseptor, en G-protein-koblet reseptor på cellemembranen til tyreoideas follikulærceller. Stimulus fra TSH gir økt jodopptak, syntese og frigjøring av TH, og kan ha vekststimulerende effekt på follikkelcellene.

Lave fT₄- og fT₃-nivåer fremmer syntese av TRH fra hypothalamus og frigjøring av TSH fra adenohypofysen, og plasmakonsentrasjonen til TSH øker. Tilsvarende faller TSH-nivåene i sirkulasjonen ved høye verdier av fT₄ og fT₃. Tyrotrofene i adenohypofysen medierer negativ feedback via en indirekte og en direkte reaksjonsvei. I den indirekte feedback-loopen gir økt konsentrasjonen av T₃ inne i tyrotrofene redusert antall TRH-reseptorer på tyrotrofenes cellemembran, og tyrotrofenes sensitivitet for TRH senkes. Den direkte feedback-loopen gir redusert syntese av TSH, ved at TSH-genene har T₃-bindende responselementer (RE) i promoterregionen som virker inhiberende.



© Elsevier Ltd. Boron & Boulpaep: Medical Physiology, Updated Edition www.studentconsult.com

Figur 3 Hormonaksen (10).

De fleste vev har muligheten til å dejdere T4 til det mer biologisk aktive T3 eller det inaktive rT3 ved hjelp av dejdinaser. I lever, nyre og tyreoida genereres mesteparten av T3 som går ut igjen i sirkulasjonen av 5'/3'-dejdinase type 1 (D1). I hypofysen, sentralnervesystemet (SNS) og placenta omgjøres T4 til T3 av 5'/3'-dejdinase type 2 (D2), og T3 virker direkte i disse vevene. D1 senker omgjøringen av T4 til T3 ved kalori restriksjoner og alvorlig stress, slik at metabolismen reduseres. D2 i hypofysen er av spesiell betydning for feedbackhemningen av TRH og TSH, men påvirkes ikke av stress som D1. TSH vil derfor ikke stimulere til mer syntese og frigjøring av TH ved stresstilstander, da T3-nivåene i thyrotrofe holder seg normale. 5/3-dejdinase (D3) gjør T4 om til det inaktive hormonet rT3, og er dermed med på regulering av THs virkningsgrad i perifert vev (10).

Peptidhormonene T3 og T4 virker ved å binde til og aktivere nukleære reseptorer, i likhet med steroidhormonene. TH diffunderer gjennom cellemembranen eller kommer inn i målcellen via bærerproteiner (10). I følge Anderson (2008) er flere proteiner fra OATP-familien (Organic anion transporting polypeptide), LAT-1 (L-type amino acid transporter-1) og MCT8 (Monocarboxylate transporter 8) vist å være viktige for opptak av TH til hjernen. MCT8 er funnet å være viktig for å transportere TH inn i nevroner (12). I cytoplasma omgjøres noe av T4 til T3, og både T4 og T3 kommer inn i cellekjernen gjennom cellekjernens poresystem. I cellekjernen binder TH til tyreoidhormon-reseptor (THR) (10). THR kan binde seg til "thyroid responsive element" (TRE) på DNA

som en homodimer eller som en heterodimer, sammen med retinoid X-reseptor (RXR) (11). De hormonbundne reseptorene kan enten aktivere eller hemme transkripsjon av spesifikke gener via TRE.

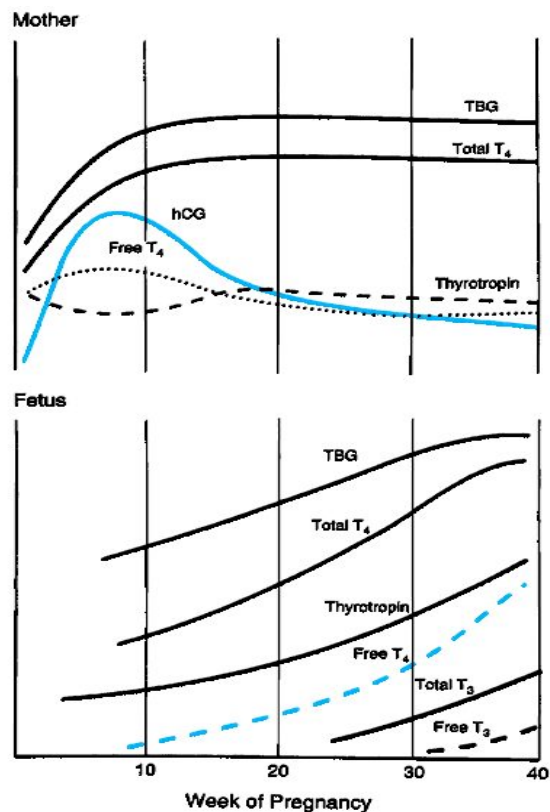
TH regulerer basalstoffskiftet (BMR) ved å virke på både katabolske og anabolske prosesser i fett-, protein- og karbohydratmetabolismen (10).

Tyreoideahormonene og svangerskapet

I første trimester er fosteret avhengig av at morens TH kommer over placenta da det ikke produserer hormoner selv. Ved maternell hypothyreose kan barna blant annet bli mentalt retarderte og ha reduserte motoriske ferdigheter (13). Betydelige utviklingsforsinkelser og mental retardasjon sees også ved maternell hypothyreose (8).

Graviditet i seg selv gir funksjonelle og strukturelle endringer i morens tyreoidea. Under graviditeten øker tyreoidea den totale TH-produksjonen med 40 til 100 prosent. Kjertelen gjennomgår moderate forandringer som glandulær hyperplasi og økt vaskularitet. Dette endrer ikke maternell TH-status når den måles i metabolske studier. Det meste av økningen av basalstoffskiftet hos gravide kan tilskrives økt oksygenforbruk i forbindelse med føtal metabolsk aktivitet. Dersom føtal kroppsoverflate vurderes sammen med den gravides kroppsoverflate er basalstoffskiftet det samme som hos ikke-gravide (14;15).

Nivået av TBG øker i løpet av første trimester og når stabilt toppnivå rundt uke 20 (Fig. 4). Tilsvarende øker total T4 kraftig mellom 6. og 9. uke, og når platå ved 18 uker. hCG-nivåene er på toppnivå ved 12 uker, samtidig med at fT4 øker og undertrykker TSH-sekresjon fra adenohypofysen. Hos 80 % av gravide kvinner vil TSH-nivåene synke, og dette kan gi en oppfattelse av subklinisk hypertyreose. Etter hvert returnerer fT4 til normalnivå. Økning i total T3-nivå er også uttalt og når platånivå ved 18 uker. Maternell TSH krysser ikke placenta. TRH øker ikke gjennom svangerskapet, men kan passere placenta og stimulere fosterets hypofyse til å skille ut TSH (14;15). Det føtale nivået av fT4, fT3 og TBG øker jevnt gjennom svangerskapet. Sammenlignet med verdier for voksne, er det føtale nivå av TSH ved 36 uker høyere, total og fT3 er lavere og fT4 er på likt nivå. Det høye nivået av TSH i forhold til fT4 antyder at hypofysen og det negative feedbacksystemet fortsatt er umodent (9). Maternelle TH er viktig for fosteret fram til fødsel, og står for 30 % av føtalt T4 ved termin (15).



Figur 4 Nivå av sirkulerende hormoner relatert til tyreoidfunksjon hos mor og foster. Fra (14).

Noen kvinner kan få en forbigående hypertyreose når hCG-nivået er på topp, dersom hCG-nivåene blir unormalt høye. Strukturlikheten mellom glykoproteinene hCG og TSH gjør at hCG i høye doser kan stimulere maternell tyreoida ved at hCG kryssreagerer med TSH-reseptor (14;16).

Hypertyreose

Hypertyreose er en tilstand der kroppen utsettes for økte nivåer av TH på grunn av økt produksjon og frigjøring fra tyreoida. Tyreotoksikose brukes ofte synonymt, men beskriver en tilstand når kroppen utsettes for høye nivåer av tyreoidahormoner uavhengig årsak, for eksempel på grunn av tilførsel av tyroksin eller destruksjon av tyreoida som ved tyreoiditt (17). Tilstanden er relativt vanlig hos voksne. 2,5 % av norske kvinner og 0,6 % norske menn har ifølge undersøkelsen HUNT i Nord-Trøndelag fått påvist hypertyreose i løpet av livet. Hos de yngre pasientene er Graves sykdom den vanligste årsaken, hos eldre sees oftest toksisk nodulær knutestruma (17;18). Symptombildet ved hypertyreose er variert og mangfoldig, på grunn av tyreoidahormonenes utbredte virkning og økt β -adrenerg effekt ved hypertyreose. Tretthet, nervøsitet, vekttap, hjertebank, varmeintoleranse og eksoftalmus er blant de vanligste plagene. Kvinner kan få menstruasjonsforstyrrelser og redusert fertilitet. Noen utvikler muskelsvakhet og beinskjørhet (19;20).

I de fleste tilfeller er TH-verdiene forhøyet og TSH-verdien lav. De vanligste behandlingsmetodene er antityreoid medikamenter (ATD), radioaktivt jod og kirurgi, avhengig av årsak og livssituasjon. Av ATD er propylthiouracil (PTU), methimazole og carbimazole, som metaboliseres til methimazole, mest brukt (20).

Maternell hypertyreose

Hos unge kvinner med hypertyreose har 85 % Graves sykdom, og sykdommen er den hyppigste årsaken til hypertyreose blant gravide. Andre årsaker til hypertyreose i svangerskap er høye nivåer av hCG, toksisk adenom, tyreoiditt og eksogen tilførsel av tyroksin (21;22). Av sekundære årsaker til hypertyreose skal TSH-frigjørende hypofyseadenom nevnes, som gir hypertyreose med økte nivåer av TSH. I tillegg kan enkelte medikamenter indusere tyreotoksikose. Det gjelder spesielt tyroksin, og jodinnholdende medikamenter (20;23).

Hypertyreose hos gravide forekommer hos anslagsvis 1 av 500-2000 kvinner i Norge hvert år (24). Antall levendefødte barn i Norge per år er ca 60 000 (25). Settes fødselstallene i sammenheng med prevalensen av gravide med hypertyreose kan man anslå at 30 til 120 norske barn kan utsettes for hypertyreose i løpet av fostertiden hvert år, forutsatt at like mange gravide med og uten hypertyreose aborterer. Det er økt risiko for spontanabort og dødfødsel ved maternell hypertyreose (21). Ifølge Glinoe (1998) har hypertyreose en prevalens på 0,1-0,4 % av alle graviditeter. Tallene bygger på et fåtall retrospektive studier. Prevalensen av forbigående hCG-indusert hypertyreose er ca 2-3 %, dersom man også medregner de som ikke har kliniske symptomer. Glinoe (1998) presenterer også en studie av 1900 gravide, screenet på TSH og fT4 mellom 8. og 14. gestasjonsuke. Halvparten av de med biokjemisk gestasjonell tyreotoksikose (GTT) hadde symptomer. Når disse tallene legges til kan prevalensen av hypertyreose blant gravide være opptil 3-4 % (26). Opptil 1800 norske barn kan da bli påvirket av maternell hypertyreose i løpet av fostertiden hvert år.

Årsaker til maternell hypertyreose

Millar et al. (1994) gjorde en studie blant 181 gravide kvinner med påvist hypertyreose. Blant disse hadde 88 % Graves sykdom, 10 % multinodulært toksisk knutestruma, to kvinner (1 %) subakutt tyreoiditt og en kvinne (0,6 %) toksisk adenom. Kvinner med forbigående hypertyreose i forbindelse med hyperemesis gravidarum, og kvinner som tidligere var behandlet for hypertyreose og var eutyreote under svangerskapet ble utelukket fra studien (27).

Rundt 1 % av gravide kvinner har tidligere vært behandlet, eller er under behandling, for Graves sykdom (28). Graves sykdom er en autoimmun tilstand der det finnes TSH-reseptor-antistoffer (TRAb) i sirkulasjonen som etterligner TSHs virkning på tyreoida og stimulerer kjertelen til vekst og overproduksjon av hormoner. Assosiert med Graves er oftalmopati og hudsykdommer. Sykdommen trigges hos genetisk utsatte personer av miljøfaktorer som stress, tilførsel av kjønnshormoner og for mye jod i kostholdet (20). Forløpet av sykdommen under graviditeten er variabelt. Hos kvinner som ble diagnostisert med Graves sykdom før de ble gravide, kan graviditeten i seg selv gi reduksjon i sykdomsaktiviteten. Noen kvinner har hypertyreose ved starten av graviditeten eller behandles med ATD. Det er sjeldent at Graves debuterer under graviditet, men det forekommer (28).

Ved multinodulært toksisk knutestruma er det to eller flere autonome knuter i tyreoida som skiller ut store mengder TH, og pasienten får oftest typiske symptomer på hypertyreose. I USA sees sykdommen oftest hos voksne over 50 år, men i deler av verden med jodmangel rammer sykdommen også yngre voksne. Årsaken er ikke kjent, men det er sannsynlig at enkeltceller gjennomgår mutasjoner som fører til klonal ekspansjon av knuter som får autonome tyreoid egenskaper. Ved toksisk knutestruma produserer solitære adenomer store mengder TH (20).

Som ved de fleste andre tyreoidesykdommer rammer tyreoiditter kvinner i større grad enn menn (23). Hashimotos tyreoiditt, også kalt kronisk lymfocytisk tyreoiditt, er en autoimmun tilstand som karakteriseres av den gradvise destruksjonen av tyreoida. Hypothyreose utvikles gradvis, og tyreoida er vanligvis symmetrisk forstørret. I noen tilfeller kan Hashimoto innledes av en forbigående tyreotoksikose forårsaket av follikkelceller i oppløsning (23). Subakutt lymfocytisk tyreoiditt, "silent" tyreoiditt, oppfattes av mange som en variant av Hashimotos (23). Etiologien er mest sannsynlig autoimmun, da det er mulig å påvise sirkulerende antityreoida antistoffer og lymfocytisk infiltrasjon (20).

Hypertyreose uten autoimmun årsak kan oppstå under svangerskapet hos ellers friske kvinner uten tidligere tyreoidesykdom. Tilstanden gir ikke alltid symptomer, da den oftest er forbigående i første trimester når hCG når maksimalverdien (26). Ved manifest hypertyreose på grunn av høye hCG-nivå vil tyreotoksiske symptomer oppstå tidlig i graviditeten, det er oftest fravær av struma, og pasienten oppnår spontan tilfriskning i andre trimester. Biokjemiske analyser vil vise økt s-FT3 og s-FT4, negative prøver for tyreoida-antistoffer og høyt nivå av sirkulerende hCG (29). Etiologien er relatert til hCGs stimulerende effekt på tyreoida, men årsaken til unormalt høye hCG-nivåer er ukjent (26).

Gestasjonell tyreotoksikose (GTT) defineres av Glinoer som en tilstand med unormalt høye verdier av hCG og FT4, og lav TSH, der verdiene holder seg unormale til langt ut i andre trimester. Ifølge Glinoers undersøkelser var klassiske symptomer på hypertyreose, som vekttap eller mangel på vektøkning, takykardi og utmattelse tilstede hos halvparten av kvinnene med biokjemisk påvist GTT. Hyperemesis gravidarum ble observert hos kvinnene med høyest grad av tyreotoksikose. GTT er direkte assosiert med høye hCG-verdier og varigheten av hCG-økningen. Alle tilfeller av GTT er forbigående, og GTT er ikke assosiert med uheldig utfall av graviditet. Spontan remisjon av hypertyreosen og normalisering av FT4 korrelerer med reduserte hCG-nivåer og bedring av svangerskapskvalme (26).

Ubehandlete og vanskelige tilfeller med hypertyreose har høyere insidens av preeklampsi, hjertesvikt, og ulike perinatale hendelser, som spontanabort, dødfødsel, for tidlig løsning av morkaken, prematuritet og lav fødselsvekt. I alvorlige tilfeller kan tyreotoksisk krise utvikles. Kvinner som har tyreotoksikose ved nedkomst opplever oftere for tidlig fødsel, perinatal mortalitet og maternell hjertesvikt (21;28).

Kongenitt hypertyreose

Insidensen av kongenitt hypertyreose varierer fra 1:4000 til 1:40 000 i følge ulike forfattere, og tallene er basert på neonatal screening. Det er ingen kjønnsforskjell (1). I Norge vil det si at fra 1-15 barn fødes med kongenitt hypertyreose hvert år.

Årsaker til kongenitt hypertyreose

Klinisk hypertyreose er funnet hos ca 1 % av nyfødte av mødre med Graves sykdom, og maternell Graves sykdom er den vanligste årsaken til kongenitt hypertyreose (1). Oppfølging og behandling av mødre med Graves har betydning for barnets metabolske status ved fødsel (15). Den lave insidensen av neonatal hypertyreose kan forklares med reduserte antistofftitre utover i graviditeten, da nivået av antistofftitre korrelerer med hvor mye antistoff som passerer placenta. Tilstanden omtales som "autoimmune congenital hyperthyroidism", fordi barnet utsettes for mors antistoffer ved maternell autoimmun tyreoidesykdom, og er forbigående.

Autoimmun tyreoiditt hos mor kan også gi neonatal hypertyreose, men er en sjeldnere årsak til kongenitt hypertyreose enn Graves sykdom (8). "Late onset" kongenitt hypertyreose er beskrevet av Zakarija, McKenzie og Hoffman (1986) hos flere barn av en mor med Hashimotos tyreoiditt (30). Tyreoideastimulerende antistoffer var tilstede, og forholdet mellom mengden av tyreoideablokkerende og tyreoideahemmende immunoglobuliner hos mor kan bestemme manifestasjonen av sykdommen hos barnet, også i tilfeller der mor ikke har vist tegn på hypertyreose, fordi de stimulerende antistoffene har lengre halveringstid (8;30).

Noen tilfeller av vedvarende "non-immune congenital hyperthyroidism" er beskrevet. Denne tilstanden er forårsaket av aktiverende mutasjoner i TSH-reseptoren. Reseptoren blir ikke hemmet, det oppstår TSH-uavhengig stimulering av tyreoidea, og TSH-reseptoren er konstitutivt aktiv og opererer uavhengig binding av ligand. Mutasjoner i TSH-reseptorgenets transmembrane og intracytoplasmatiske domene går igjen i flere kasus med kongenitt hypertyreose og andre tilfeller av autonom tyreoideafunksjon (8;31). Genkoden for TSH-reseptorens transmembrane og intracellulære domene er lokalisert på kromosom 14q13 i ekson 10 (16).

Kopp et al. (1995) beskriver et kasus der en gutt med ikke-autoimmun kongenitt hypertyreose fikk påvist en punktmutasjon i gensegmentet som koder for TSH-reseptorens sjette transmembrane heliks (31). Pasienten var heterozygot for mutasjonen, som førte til en substitusjon av leucin (TTC) for fenylalanin (CTC) i posisjon 631 på en allele. Mutasjonen ble ikke funnet hos noen andre av de undersøkte familiemedlemmene. Den samme aminosyresubstitusjonen er funnet å være årsaken til hypertyreose i noen tyreoidea-adenomer, men er ikke funnet i normale tyreoideavev. Dette kan tyde på at noen lokalisasjoner på TSH-reseptorgenet kan være såkalte «hot spots»; sekvenser på DNA som har økt mutagenese eller klonal ekspansjon (31). Arvelighet for ikke-autoimmun kongenitt hypertyreose er ikke bevist. Uklarhet om arvegang kan ha sin årsak i at de med ubehandlet kongenitt hypertyreose vil ha redusert fertilitet, redusert intellekt og reduserte fysiske egenskaper, slik at det er mindre sannsynlig at de får etterkommere (8).

Krude et al. (1997) presenterer en studie av en familie med flere tilfeller av alvorlig hypertyreose i tre generasjoner i alderen 10-34 år, uten tegn til autoimmunitet, der en germ line-mutasjon (Val509Ala) i TSH-reseptoren med dominant arvegang forårsaket hypertyreose i familien. Genfeilen har ikke induisert hypertyreose føtalt eller neonatalt, og de få tilfellene av ikke-autoimmun kongenitt hypertyreose har ikke familiær opphopning av hypertyreose (8).

Symptomer ved kongenitt hypertyreose

Føtal diagnostikk av hypertyreose gjøres ved hjelp av ultralyd. Føtal struma, takykardi, hjertearytmi, vekstretardasjon, høy grad av motilitet og akselerert benmodning er tegn på føtal hypertyreose (26;28). På grunn av fosterets økte metabolisme og en tilsvarende placentasvikt, sees fosterhypotrofi hos nesten alle. Mange barn utsatt for hypertyreose under svangerskapet fødes for tidlig, men de fleste fødes etter 30. uke (8).

I nyfødtpperioden kan røntgen eller ultralyd avdekke avansert benmodning, og barna kan ha en unormal hodeform. Postnatale tegn er irritabilitet og uro, takykardi, hypertensjon, arytm, diare, dårlig vektøkning, og det kan finnes struma. Hjertesvikt kan oppstå ved alvorlig og ubehandlet hypertyreose, og bidrar til en mortalitet på 16 %. Andre sykdomstegn er gulsott, hepato- og

splenomegali og trombocytopeni. I tillegg kan barna ha forhøyet kroppstemperatur og hyperaktive reflekser (8;32). Dersom barna har en forbigående kongenitt hypertyreose, vil symptomene oppstå i løpet av første levemåned, og forsvinner som regel innen 2 til 4 måneder (8).

Høye TH-nivåer i fostertiden og neonatalperioden kan gi alvorlige forsinkelser i utviklingen, og mental retardasjon (8;16;32). Hovedkomplikasjonen ved persisterende hypertyreose i neonatal- og småbarnsperioden er kraniosynostose, som fører til redusert hodeomkrets på grunn av prematur modning av kraniosuturene (8). I alvorlige tilfeller må kraniosynostosen behandles kirurgisk for å unngå komplikasjoner som høyt intrakranielt trykk og asymmetrisk ansiktsform (33). Daneman og Howard (1980) gjorde en langtidsstudie av 9 barn med kongenitt hypertyreose, som alle var barn av mødre med Graves sykdom. Barna ble fulgt i gjennomsnitt 3,5 år og ble blant annet undersøkt med radiografi av kraniet og psykologiske tester. Kraniosynostose var tilstede hos 8 av barna som ble undersøkt med radiografi. Ingen av disse fikk unormal hodeomkrets eller økt intrakranielt trykk. De fant også at 4 av de 7 barna som ble undersøkt med psykologiske tester hadde varierende grad av intellektuell svekkelse, fra å ha et mildt perseptuelt handikap til en alvorlig psykomotorisk retardasjon. Dette korrelerte med tilstedeværelse av kraniosynostose hos de 4 barna. Likevel skal ikke direkte effekt av høye TH-nivåer under hjerneutviklingen utelukkes (32).

Behandling av kongenitt hypertyreose

Ved maternell hypertyreose vil ufysiologiske gradienter av T4 bidra til at fosteret blir utsatt for høye T4-nivåer. ATD krysser placenta i stor nok grad til at de hemmer fosterets tyreoida, og det kan være ønskelig å intensivere behandlingen med ATD til mor. Når mor er behandlet ablativt for Graves sykdom kan fosteret likevel utsettes for stimulerende antistoffer. Krude et al. (1997) anbefaler da å behandle mor med ATD for fosterets skyld og gi tilførsel av levotyrosin til mor for å unngå maternell hypotyreose. Nyfødte med hypertyreose som følge av antistoffer fra mor får symptomatisk behandling i tiden det tar før antistoffene er utskilt. ATD, som methimazole eller PTU er sentrale. Det er viktig å balansere til eutyreoid metabolsk status da det neonatale sentralnervesystemet er sårbart for både hypo- og hypertyreose. Krude anbefaler å monitorere tyroksinnivåene jevnlig, og raskt gi tyrosin dersom hypotyreose oppstår under behandling (8).

Ved ikke-autoimmun kongenitt hypertyreose vil barna få samme behandling etter fødsel som ved de autoimmune. Det anbefales å fjerne tyreoida tidlig i barneårene da ATD har vist å ikke være tilstrekkelig i flere tilfeller. Postnatal behandling kan bli for sent, derfor er det viktig å behandle mødre med hypertyreose. Ved ikke-autoimmun kongenitt hypertyreose er oppdagelsen av hypertyreose hos fosteret vanskelig, fordi mor oftest ikke har en kjent tyreoidesykdom (8).

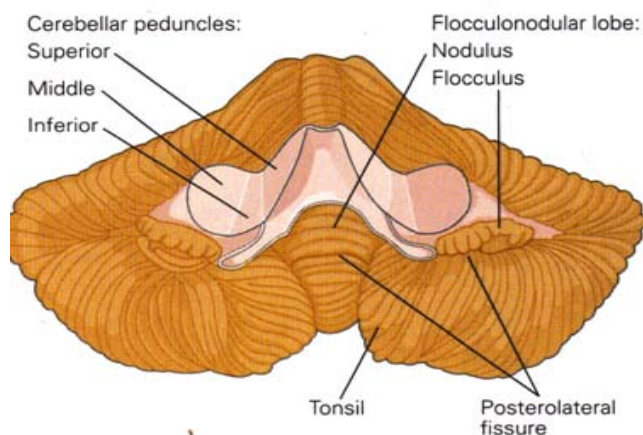
Cerebellum

Cerebellum får store mengder informasjon som den bearbeider og integrerer, før informasjonen videresendes. Den kontrollerer blant annet frivillige bevegelser, hodets stilling i forhold til kroppen og øyebvegelser. Utover det motoriske er også cerebellum delaktig i ulike kognitive oppgaver.

Anatomi

Cerebellum ligger i bakre skallegrop, og er forbundet med hjernestammen ved nedre, midtre og øvre lillehjernerstilk. Stilkene består av hvit substans, myelinkledde aksoner, som fører signaler til og fra

lillehjernen. Lillehjernen har forbindelser med ulike områder i storhjernebarken, thalamus, hjernestammen og ryggmargen (34).



Figur 5 Cerebellum ventralt. (35).

Vermis er et smalt midtparti som deler cerebellum i to hemisfærer. Ved midtre lillehjernestilk ligger flocculus. Overflaten er foldet, med tversgående folier og furer. De dypeste furene deler cerebellum i flere lobi. Figur 5 viser ventralsiden av cerebellum.

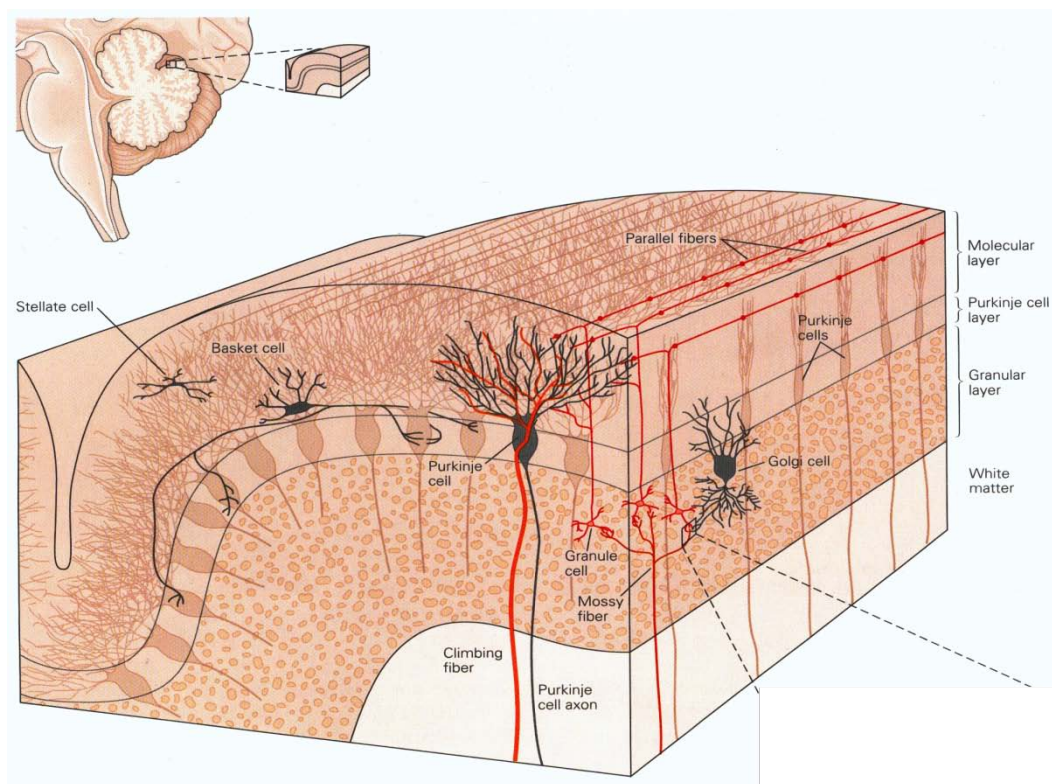
Cortex cerebelli har et tynt lag grå substans i tre lag. Ytterst ligger molekylærlaget, purkinjecellelaget ligger i midten og korncellelaget innerst. I fosterlivet ligger et fjerde lag, det ekstragranulære lag, utenfor molekylærlaget. Oppbygningen (Fig. 6) er mye enklere enn i cortex cerebri, men antallet nevroner i lillehjernebarkens cortex er mye høyere enn i storhjernen fordi korncellelaget er svært tettpakket med små nevroner. Dypt i den underliggende hvite substans ligger de fire cerebellarkjernene nucleus Dentatus, nucleus Fastigii og nucleus Interpositus anterior og posterior.

Molekylærlaget inneholder dendritter av purkinjecellene og aksoner fra de dypere lagene og noen få nevroner, blant annet internevroner, såkalte stjerneceller (stellate cells) og kurvceller (basket cells). Purkinjecellelaget inneholder de store purkinjecellene, som er de eneste nevronene som sender efferente fibre ut fra cerebellarkorteks, og virker inhibitorisk via GABA. Korncellene inneholder glutamat og virker eksitatorisk på purkinjecellene og internevronene. De fleste av cerebellums internevroner er inhibitoriske, inneholder i hovedsak GABA og eksiteres av parallellfibrene til korncellene (34).

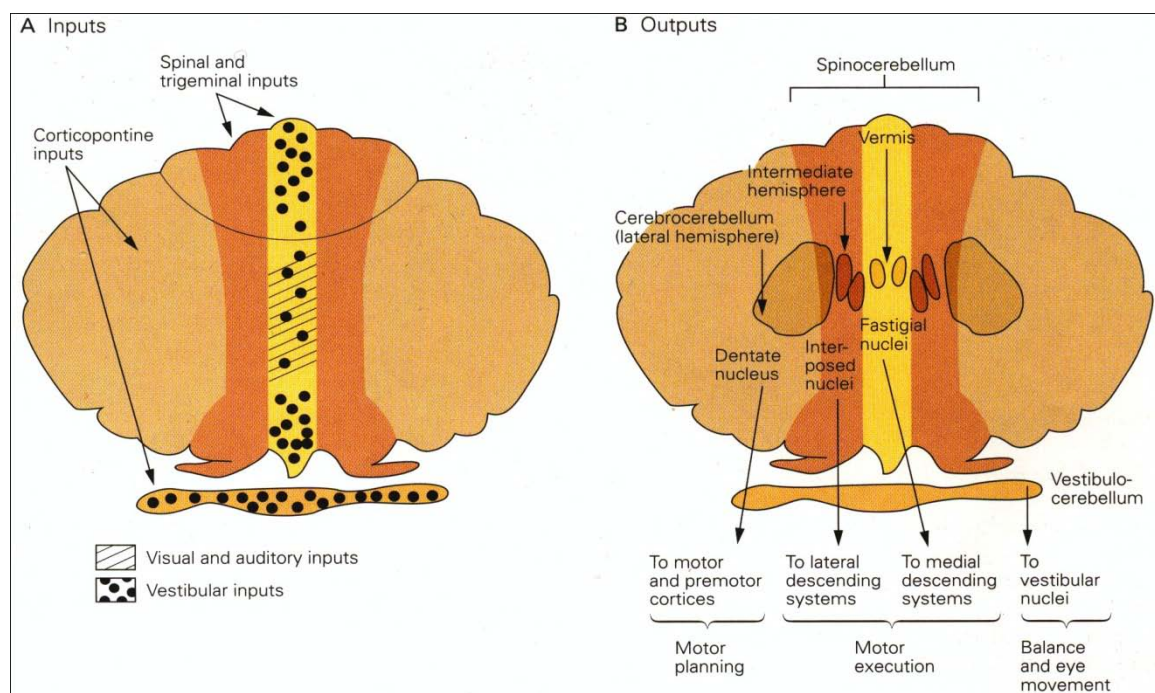
Korncellelaget inneholder svært mange små kornceller, i tillegg til internevroner, de inhibitoriske golgicellene og de eksitatoriske unipolare børstecellene (brush cells) (36). Aksonene fra korncellene krysser purkinjecellelaget og går utover i molekylærlaget, der de deler seg i to parallellfibre som forløper i folienes lengderetning. Parallellfibrene danner synapser med purkinjecellens dendritter som strekker seg opp i molekylærlaget, sterkt forgrenet og orientert vinkelrett på parallellfibreneres lengderetning.

Signaler inn til cerebellum medieres av klatrefibre og mosfibre, som inneholder glutamat og virker eksitatorisk. Klatrefibrene kommer fra oliva inferior, forgrener seg i molekylærlaget og ender på dendrittene til purkinjecellen. De andre afferentene, de spinocerebellære, vestibulocerebellære og

pontocerebellære, kalles mosfibre. Disse forgrener seg og ender i korncellelaget der de danner synapser på dendrittene til et stort antall kornceller. I hovedsak går informasjon direkte til lillehjernebark, som sender bearbeidet informasjon til de dype cerebellarkjernene, som påvirker ulike nevrongrupper via efferente fibre (34).



Figur 6 Lillehjernebark. (35).



Figur 7 Afferente og efferente forbindelser i cerebellum. (35).

Funksjon

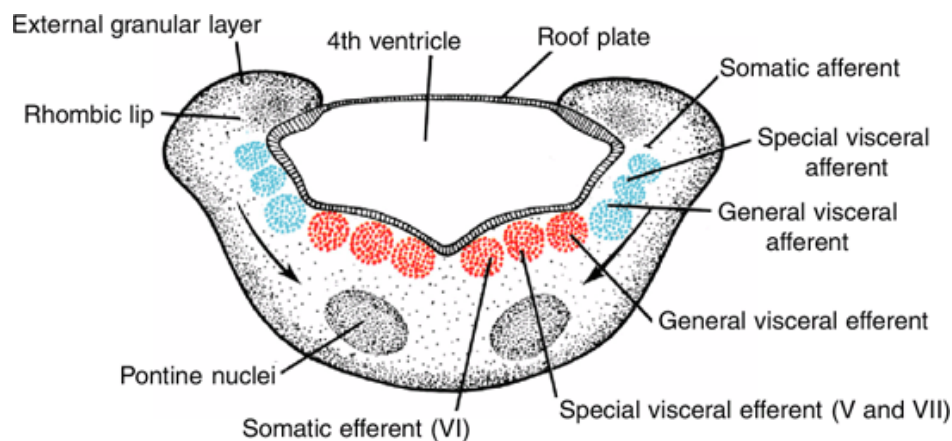
Cerebellum er delt inn i tre funksjonelt forskjellige deler (Fig. 7), som følge av de ulike fiberforbindelsene fra sentralnervesystemet til lillehjernebarken. Inndelingen sammenfaller i stor grad etter hvor de afferente fibre kommer fra, og som regel virker cerebellum tilbake på de samme nevrongruppene. Det kommer mest informasjon fra storhjernebark, som planlegger, utfører eller behandler bevegelsesinformasjon. Cerebellum sender informasjon tilbake til de motoriske barkområdene, likevektskjernene og medulla spinalis via retikulærsubstansen. Lobus flocculonodularis kalles vestibulocerebellum fordi den mottar fibre fra likevektsapparatet og likevektskjernene. Spinocerebellum, som består av fremre del av vermis og intermediærsonen, mottar fibre fra medulla spinalis. Cerebrocerebellum, lillehjernehemisfærene, mottar informasjon fra cortex cerebri via pons. Cerebellums funksjon gjenspeiler de anatomiske forbindelsene mellom cerebellum og resten av sentralnervesystemet.

Skader i cerebellum gir blant annet usikre, rykkvise bevegelser av øynene (nystagmus), ubalanse (ataksi), dysartri og intensjonstremor. Men lillehjernen har også en rolle i koordinering og innlæring av viljestyrte bevegelser. Den er ikke ansvarlig for igangsetting av bevegelser, men er koblet i sidesløyfer for de sentrale motoriske banene (34).

Schmahmann (1998) forklarer cerebellums viktighet i utførelse av kognitive handlinger ved å beskrive "the cerebellar cognitive affective syndrome" hos voksne. I syndromet inngår tegn på redusert evne til å utføre eksekutive funksjoner som planlegging, skifte av oppmerksomhet og abstrakt resonnering, i tillegg til redusert ordflyt og arbeidshukommelse. Pasientene kan også ha problemer med spatial kognisjon, som visuospatial organisering og hukommelse. Personlighetsendringer sees i form av følelsesmessig avstumpning ("blunting of affect"), disinhisjon og upassende atferd (37).

Utvikling av cerebellum

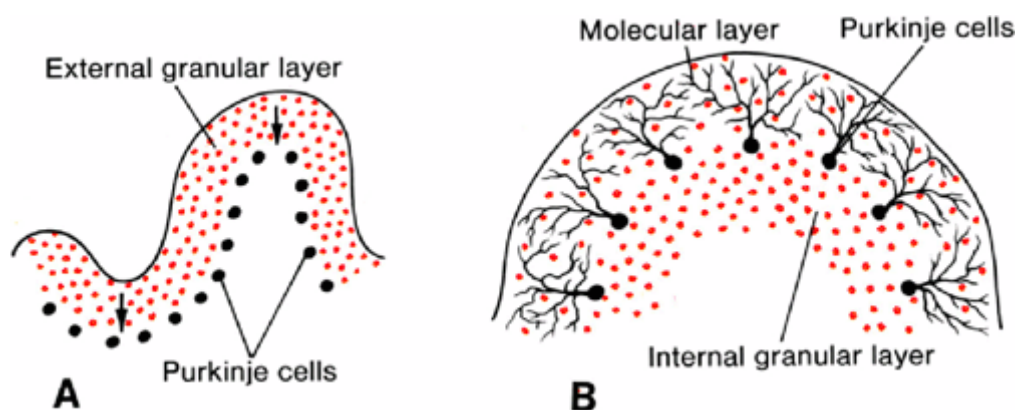
Etter hvert som flere nevroblaster tilkommer marginalsonen i nevralkrøret i 4. svangerskapsuke dannes det fortykkelser på hver side av nevralkrøret. Den ventrale fortykkelsen, basalplaten, og den dorsale fortykkelsen, alarplaten, representerer henholdsvis motoriske og sensoriske områder. I metencephalon dannes "rhombic lips" (RL) av de dorsolaterale delene av alarplaten (Fig. 8). Ved ytterligere fordypning av den pontine flexur blir RL trykket kefalokaudalt, og cerebellærplaten dannes. Initialt består cerebellærplaten av et indre og ytre germinalcellelag som inneholder henholdsvis ventrikulærsonen og rostrale deler av RL. I den videre utviklingen migrerer celler fra rostrale del av RL utover mot pia og danner det ytre granulære lag (EGL) (6;36). Cellene som forlater ventrikulærsonen er postmitotiske, cellene fra RL fortsetter celledelingen etter at de har vandret og dannet EGL på overflaten av cerebellum (38).



Figur 8 Transversalsnitt gjennom kaudale deler av metencephalon under utvikling. Fra (6).

I cerebellærplaten er ventrikulærsonen utgangspunktet for de GABAerge nevronene i cerebellum (36). De glutamaterge nevronene utvikles fra den rostrale delen av RL. Cerebellarkjernerne utvikles først, korncellenes forløpere dannes senere og vandrer utover i korteks. I sjette måned vandrer korncellene innover til IGL. Kurvceller og stjerneceller dannes i hvit substans. De glutamaterge interneuronene, børstecellene, koloniserer hvit substans sent i fosterlivet før de endelig plasseres seg i IGL ved fødsel (6;36). Dannelsen av de cerebellære nevronene er strengt kategorisert, og de forskjellige nevronkategoriene utvikles til forskjellig tid. Prosjeksjonsnevronene utvikles først, mens interneuronene utvikles senere i fostertiden og tidlig postnatalt (36).

I senembryonal fase gjennomgår EGL kraftig proliferasjon, og postmitotiske granulære nevroner migrerer innover til IGL. Dette er illustrert ved figur 9. EGL kan deles inn i to lag, hvor det ytterste laget har vist størst mitoseaktivitet. De underliggende purkinjecellene kontrollerer proliferasjonen av EGL-nevroner ved å skille ut Sonic Hedgehog (Shh), som aktiverer cellesyklusregulerende gener og øker proliferasjon. Nevroner vandrer videre innover gjennom purkinjecellelaget, til det indre granulære lag (IGL), hvor differensieringen starter (36).



Figur 9 Korncelleforløpernes vandring fra EGL til IGL. Fra (6).

Cellemigrasjon, proliferasjon og apoptose som del av cerebellums utvikling

Cellemigrasjonen er avhengig av mange faktorer, som adhesjonsmolekyler og neurotransmittere, dersom hjernen skal utvikle seg normalt. Migrasjonsforstyrrelser kan oppstå ved forsinket eller feil migrering av postmitotiske nevroner, noe som kan påvirke graden av programmert celledød i utviklingen og gi funksjonsfeil i de enkelte nevron. Blant annet kan genmutasjoner, iskemi og stråling gi migrasjonsforstyrrelser, som i størst grad rammer hjernebarken og lillehjernen (34).

I proliferasjonsfasen tidlig i utviklingen dannes det et stort overtall av nevroner. Nevronene elimineres ved selektiv apoptose, også kalt programmert celledød, noenlunde samtidig som aksonene vokser ut og danner synapser med andre nevroner (34). Apoptose er en aktiv enzymatisk prosess, som kjennetegnes av en pyknotisk kjerne, eosinofilt cytoplasma og aktivering av spesifikke enzymer. Cellemembranen holdes intakt, og danner mindre apoptoselegemer som fagocytteres, uten at en inflammatorisk respons er initiert (23). For å unngå apoptose er nevronene avhengige av vekststimulerende faktorer produsert av målgruppens celler. Kun et visst antall celler overlever grunnet konkurranse om substansen. Innenfor ett system kan eliminasjonen av overtallige nevroner skje kort tid etter at aksoner av overlevende nevroner har nådd de rette nevronene. Utbredelsen av programmert apoptose er forskjellig i ulike deler av hjernen, og varierer fra 90 % av cellene i forstadiet til hjernebarken, til ubetydelige antall i ryggmargen (34).

Lavezzi et al. (2006) har undersøkt proliferasjon og apoptose i lillehjernen under utvikling, ved å undersøke 52 hjerner i en alder mellom 17. gestasjonsuke til 1 år postnatalt. Prenatalt fra gestasjonsuke 20 er proliferasjonsraten i cerebellum høy, og foregår i starten i hele lillehjernen tykkelse. Etter hvert sees prolifererende celler begrenset til EGL. Ved 2. måned postnatalt er et fåtall celler i proliferasjonsfase observert i øvre deler av EGL. Prenatalt etter gestasjonsuke 30 og første postnatale måned sees kun sporadisk apoptose. Mellom 2. og 4. måned øker antall apoptotiske celler i ytre deler av EGL. Denne prosessen øker med tilbakedannelsen, og fram til 1. leveår er graden av apoptose i EGL høy. EGL tilbakedannes i løpet av det første leveåret. Fra 2 måneder etter fødsel blir EGL progressivt tynnere, samtidig som ML øker i tykkelse og viser mindre grad av celletetthet. IGL øker også i tykkelse og viser økt celletetthet. Mellom 5. og 7. måned øker tilbakedannelsesprosessen av EGL ytterligere. Ved 10. måned består EGL av et enkelt diskontinuerlig cellelag, noen steder representerer ML det eksterne laget. 1 år etter fødsel er EGL helt borte, og lillehjernen består av tre lag (39).

Tyreoideahormoner og sentralnervesystemet i utvikling

Allerede i første trimester er maternelle T3 og T4 funnet i hjernevev hos mennesket. T3 er ikke funnet i andre vev på dette tidspunktet, noe som underbygger påstandene om at TH er viktige tidlig i utviklingen av SNS. T4 er funnet i hjernevev ved 11-14 uker gamle fostre, ved 15-18 uker øker konsentrasjonen 2,5 ganger. Også etter at fosteret selv starter å produsere TH, er den maternelle andelen signifikant (40). Ved induert hypotyreose i fostertiden hos rotter sees forsinket utvikling av nervevev i storhjernebark og av purkinjeceller i cerebellum. Nevronene er mindre og mer kompakte, de har redusert dendrittisk forgrening, endret fordeling av dendrittiske spinae og forsinket celleproliferasjon og cellemigrering. Mangelfull myelinisering i storhjernebark, visuell og auditorisk bark, hippocampus og cerebellum relateres til de nevrologiske utviklingsforstyrrelsene som er observert ved hypotyreose i dyrestudier (40).

Konsentrasjonen av TH i sirkulasjonen bestemmer tilgangen på TH i hjernen, og effekten av hormonene på cellulært nivå påvirkes av aktiviteten til deiodinasene. D2 og D3 uttrykkes i hjernen under utviklingen, og det er sannsynlig at D2-mediert deiodinering av T4 kreves for opptak av T3 i kornceller. Konsentrasjonsøkning av hormonene i sirkulasjonen sammenfaller med økning av D2-aktivitet i hjernen fram til uke 19-22, før aktiviteten avtar. Behovet for økning i lokale T3-nivå kan tyde på at TH spiller en viktig rolle i hjerneutviklingen sent i første trimester og tidlig i andre trimester (12;40). D3 beskytter muligens mot for høye T3-nivåer under utvikling av spesifikke regioner av hjernen. Anderson (2008) beskriver at forholdet mellom D2 og D3 kontrollerer T3-nivåene i lillehjernen under utvikling ved at deiodinasene presist styrer omgjøringen av T4 til aktivt T3, eller inaktivt rT3 (12).

Ifølge Ahmed et al. (2008) var TH-konsentrasjonene etter 8 ukers tyroksinbehandling av induert hypotyreose i rotter uendret i to kortikale områder, hippocampus og amygdala. Områder med lav D3-aktivitet, som medulla, cerebellum og midthjernen, viste ikke like god beskyttelse mot hypertyreose, og hadde økte nivåer av T3 i vevet (41).

Eksperimentell del – Kylling som modellsystem

Innføring

Den histologiske strukturen til kyllingfostercerebellum på embryonal dag 16-17 (ED 16-17) tilsvarer tidlig tredje trimester, cirka gestasjonsuke 25-30, hos et menneskefoster (42). Kyllinger av typen *gallus gallus* klekkes rundt dag 21, og eksperimentet ble satt i gang på ED 16. Lillehjernen til kyllingen har i motsetning til mennesket en gjennomgående hemisfære og ingen vermis. I det 17 dager gamle kyllingembryoet har lillehjernen fire lag i utvikling: det ekstragranulære laget (EGL), molekylærlaget (ML), purkinjecellelaget og det indre granulære laget (IGL). Cellene i EGL vandrer innover til IGL, og korncellemigreringen er nesten ferdig ved klekking (43). Migrasjonen i human lillehjerne er avsluttet ved 1 års alder (39).

Darras (2009) brukte kyllingembryoer for å undersøke rollen TH har i hjerneutviklingen. Man kan tenke seg at T3 har betydning tidlig i hjerneutviklingen da det er funnet TH-transportere, deiodinaser og TH-reseptorer i hjernen hos kyllingembryo ved ED 4. Dette tyder på at tilgjengeligheten av T3 kontrolleres før den embryonale tyreoideakjertelen starter hormonproduksjonen. Kyllingfostre tar

opp TH fra eggeplommen (yolk). TH-depotene i eggeplommen kan eksperimentelt både økes og reduseres, og fører til endring av utviklingsprosessene hos fuglene. T4 og T3 er vist å være tilstede i hjernen til kyllingembryo ved ED 6. TH er viktig i senere stadier av hjerneutviklingen etter at kyllingene har startet egen hormonproduksjon, noe som skjer rundt 10. levedag. Behovet for TH på senere utviklingsstadier er vist ved at embryonal hypotyreose resulterer i reduksjon av dendrittiske forgreninger av purkinjeceller og forsinkelse i korncellemigrering fra EGL til IGL (43).

Det er gjort noen få eksperimentelle undersøkelser på virkningen av hypertyreose på utviklingen av hjernen hos forsøksdyr. Nicholson og Altman (1972) undersøkte effekten av induisert hypo- og hypertyreose på celleproliferasjon og –differensiering i lillehjernebark hos nyfødte rotter. De fant at hypertyreose fører til permanent reduksjon i totalt antall celler i lillehjernen. Hos hypertyreote rotter ble det observert tidlig avslutning av celleproliferasjon og tidlig start på differensiering av celler i EGL, i tillegg til tidlig initiering av celledifferensiering i ML og IGL (44). I 1977 gjorde Lauder (1977) en liknende studie på nyfødte rotter, og undersøkte effekten av dystyreoidisme på utviklingen av EGL postnatalt. Det ble observert initialt økt grad av celleproliferasjon hos hypertyreote rotter, men celleproliferasjonen ble gjennomført raskere og avsluttet tidligere enn kontrollene. Ved hypertyreose reduseres tykkelsen av EGL raskere, men hastigheten på migrasjonen av postmitotiske celler fra EGL til IGL påvirkes ikke (45). På grunn av behov for mer kunnskap om effekten av hypertyreose på hjernens utvikling undersøkes om kornceller i IGL i lillehjernen endrer proliferasjons- og apoptoseraten ved økende tyroksinnivåer under utviklingen av cerebellum.

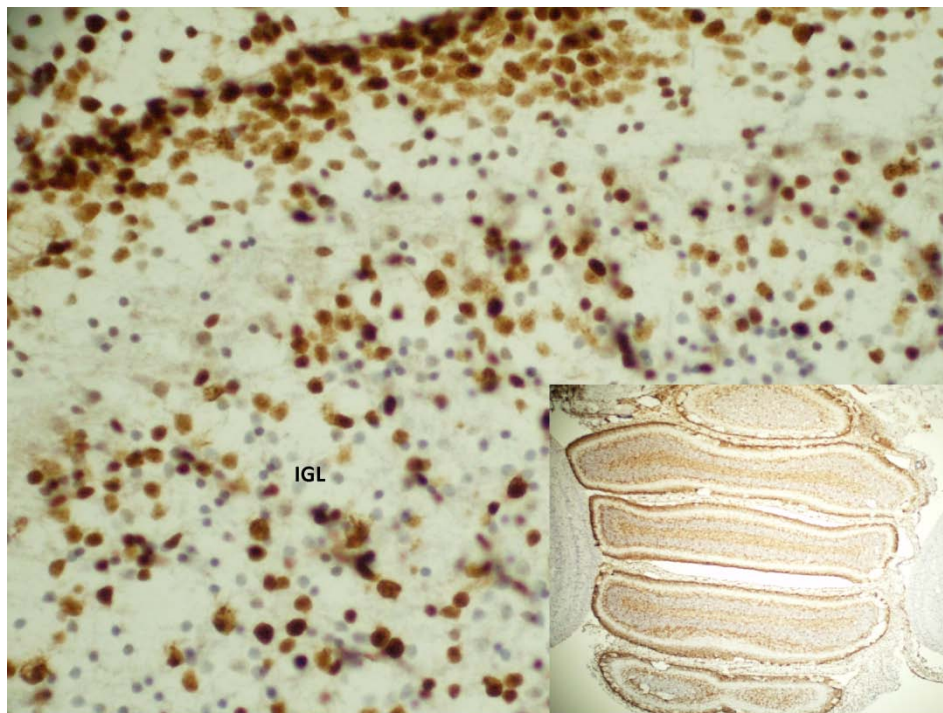
Metode

Kyllingegg (*Gallus gallus*) ble hentet fra Samvirkekylling, Nortura, og plassert i rugekasse. De ble regelmessig vannet, og gjennomlyst for å utelukke fosterdød. Kyllingeggene ble injisert via en åpning på ca 1 mm i skallet i amnionhulen på ED 16. Injeksjon i blodårer ble unngått ved gjennomlysning. Halvparten av eggene ble injisert i amnionhulen, halvparten ble injisert i luftboblen, identifisert ved gjennomlysning. Det ble injisert tre ulike doser tyroksin, og NaCl som kontroll. Tyroksin ble blandet med saltvann og Dexametason med saltvann og alkohol, til et injeksjonsvolum på 250 µl per egg på ca 50 g. Kontrollene for tyroksin bestod av 250 µl saltvann og kontrollene for Dexametason bestod av 250 µl alkohol og saltvann. Eggene ble inkubert i 24 t for å sikre fordeling av injisert substrat til kyllingfosteret før avliving.

Ved avlivningen på ED 17 ble eggene først lagt i isbad i 7 minutter, før eggene ble åpnet. Kyllinger ble dekapitert og det ble snittet i sutura sagittalis for å bedre fikseringen i hjernen. Hodet ble lagt i nummererte glass med 4 % bufret formalin og ble fiksert i ett døgn. Deretter ble hjernen tatt ut i sin helhet ved disseksjon, lagt tilbake i formalin og fiksert i ytterligere ett døgn. Hjernen ble delt ved koronarsnitt. Deretter ble preparatene støpt i parafin. Lillehjernene ble snittet opp i tynne skiver og lagt på objektglass til farging for både anti-PCNA antistoff og hematoxylin/eosin (H/E).

Kvantifisering av proliferasjon

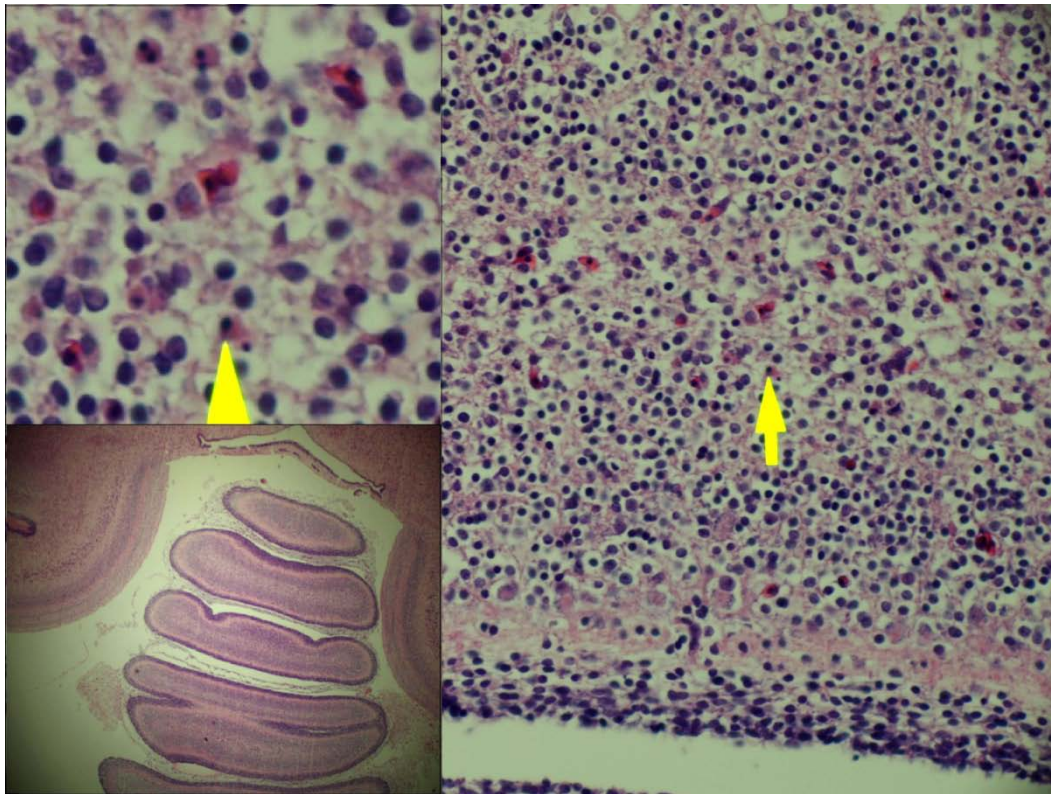
Cellekjerne uttrykker et cellekjerneantigen, PCNA, under proliferasjonen, i størst grad i S-fase i celledyklusen. Snittene ble forbehandlet i Tris/EDTA-buffer (pH 9,1) ved koking i mikrobølgeovn, før endogen peroxidase-blokkering med DAKO EnVision+ System-HRP DAB (K4007, Carpinteria, USA). Som primærantistoff ble det benyttet Monoclonal Mouse Anti-Proliferating cell nuclear antigen antibody (code M 879, clone PC10) fra Dako, fortynnet 1:3000. Polymer-HRP (horse red peroxidase) labelled mouse antibody ble brukt som sekundærantistoff. For å få fram brunfargen på de prolifererende cellene ble substrat-buffer med DAB (diaminobenzidine)-kromogen tilsatt. Kjernefarging med hematoxylin ble gjort tilslutt. Det ble tatt 3 bilder av hvert snitt, på ulike foliae på 40 x forstørrelse, med maksimal lystyrke i mikroskopet og ISO 1600. Celletellingen av antall brune celler blant alle cellekjernene i IGL ble gjennomført ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ.



Figur 10 PCNA-farget snitt i 40x forstørrelse. I utsnittet nederst til høyre ser man et koronarsnitt av hele lillehjernen med til sammen 5 folia. Det vises en forstørret del av et folium med EGL, ML, purkinjecellag og IGL.

Kvantifisering av apoptose

Apoptotiske celler farget med H/E fremstår som kondenserte og fragmenterte kjerner i eosinofilt cytoplasma. På hvert H/E-snitt ble 10 synsfelt på 40x forstørrelse i lysmikroskop telt for apoptoseceller i IGL i cerebellum, og gjennomsnittet av de 10 synsfeltene ble utregnet.



Figur 11 Flere celler i apoptose kan identifiseres ved 40x forstørrelse. Pil på et eksempel. Nederst til venstre sees lillehjernen med folia (bildene er fra samme snitt).

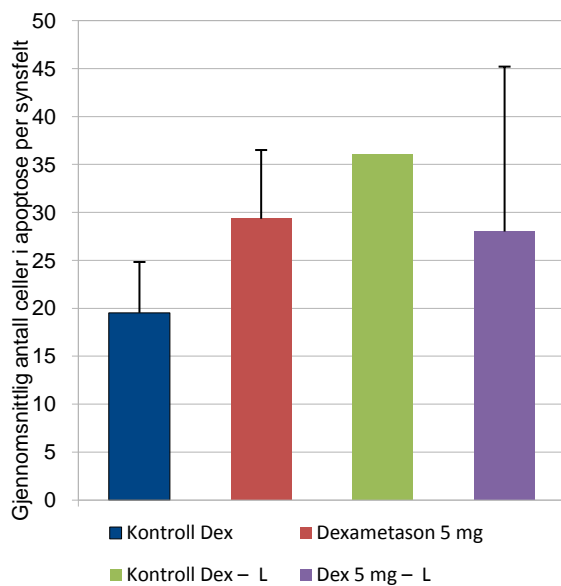
Resultater

Metodeutprøving

Egg ble injisert med Dexametason (Dex) 5 mg og kontroll, enten i amnionhulen eller i luftboblen (Fig. 12 A). I serien der eggene ble injisert i amnionhulen, øker Dex-behandling antall apoptotiske celler i IGL i forhold til kontroll (Fig. 12 B). Man kunne ikke finne den samme effekten med injeksjon i luftboblen. Injeksjon i amnionhulen ble brukt som standardmetode i de påfølgende forsøk.



A



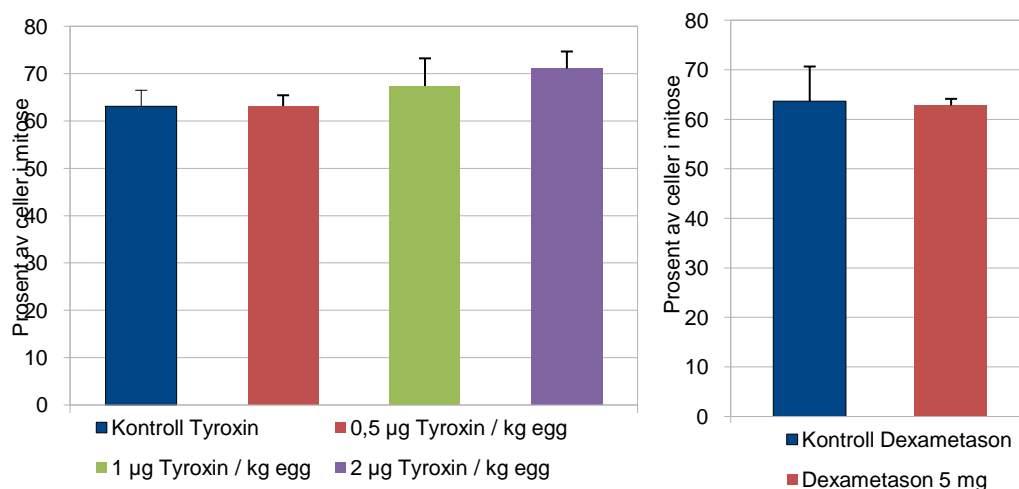
Injisert	Snitt nr	Sum antall celler i apoptose i 10 synsfelt:	Gj.snitt	SEM
Kontr. Dex. Saltvann og alkohol	1269	15,6	19,5	5,3
	1270	13		
	1271	30		
Dex 5 mg	1266	37	29,3	7,17
	1267	36		
	1268	15		
Kontr. Dex. Saltvann og alkohol - L	1286	36	36	
Dex 5 mg - L	1284	11	28	17,2
	1285	45		

B

Figur 12. Metodeutprøving. (A) Egg ble injisert på ulike steder. Figur modifisert etter (46). **(B)** Antall apoptotiske celler ble kvantifisert i IGL på H/E-snitt. Egg ble injisert enten i amnionhulen (mørkeblå og mørkerøde stolper) eller i luftboblen (lysegrønne og fiolette stolper). Resultatene er vist med SEM (n=1).

Proliferasjon

Det sees en svak tendens til økt mitoserate ved økende dose tyroksin. Kontrollserien med Dexametason viser ingen forskjell i mitoserate.

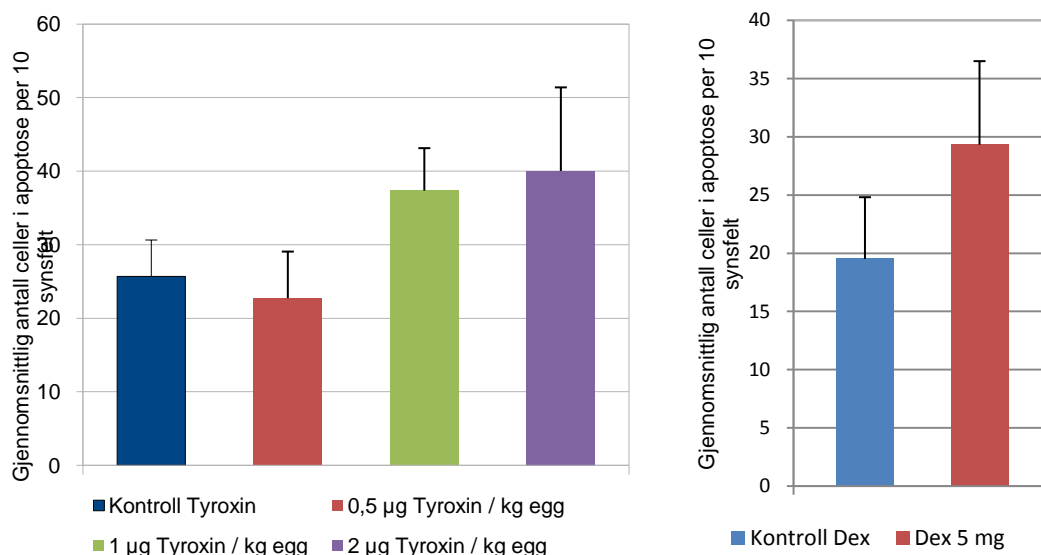


Injisert	Snitt	Gj.snitt av brune celler ift totalantall av kjerner på undersøkte snitt i %	Gj.snitt av samme dose i %	SEM
Kontroll saltvann	1263	66,12	63,10	3,4
	1264	56,30		
	1265	66,89		
0,5 µg Tyroxin / kg egg	1254	58,95	63,16	2,29
	1255	63,67		
	1256	66,85		
1 µg Tyroxin / kg egg	1257	79,06	67,38	5,86
	1258	60,66		
	1259	62,43		
2 µg Tyroxin / kg egg	1260	74,31	71,10	3,59
	1261	63,93		
	1262	75,07		
Dex ktr. Saltvann og alkohol	1269	76,94	63,68	6,97
	1270	53,30		
	1271	60,81		
Dexametason 5 mg	1266	62,20	62,80	1,32
	1267	60,88		
	1268	65,33		

Figur 13 Oversikt over PCNA positive celler (brune) i forhold til totalt antall kjerner (blå) i undersøkte snitt. Egg ble behandlet med økende doser av Tyroksin: 0,5 – 1 - 2 µg Tyroksin / kg egg og kontroll. En kontrollserie ble behandlet med Dexametason 5 mg og kontroll. Celler i mitose ble kvantifisert ved hjelp av Image J software. Resultatene er vist med SEM (n=1).

Apoptose

Det er en tendens til økt apoptose i kornceller i cerebellum hos embryonal kylling ved økende dosering av tyroksin. Dexametasonserien viser som forventet økt apoptoserate ved injeksjon av Dexametason 5 mg (42).



Injisert	Snitt nr	Sum antall celler i apoptose i 10 synsfelt per snitt:	Gj.snitt	SEM
Kontr. Saltvann	1263	29	25,7	4,91
	1264	16		
	1265	32		
0,5 µg Tyroxin / kg egg	1254	34	22,7	6,35
	1255	22		
	1256	12		
1 µg Tyroxin / kg egg	1257	26	37,3	5,78
	1258	41		
	1259	45		
2 µg Tyroxin / kg egg	1260	24	40,0	11,37
	1261	62		
	1262	34		
Kontr. Saltvann og alkohol	1269	15,6	19,5	5,3
	1270	13		
	1271	30		
Dex 5 mg	1266	37	29,3	7,17
	1267	36		
	1268	15		

Figur 14 Gjennomsnitt av celler i apoptose per 10 synsfelt per snitt ved økende dose tyroksin. Egg ble injisert med økende dose tyroksin: 0,5 – 1 - 2 µg Tyroksin / kg egg og kontroll. En kontrollserie ble behandlet med Dexametason 5 mg og kontroll. Antall apoptotiske celler ble histologisk identifisert og kvantifisert i IGL på H/E-snitt. Resultatene er vist med SEM (n=1).

Diskusjon

Metodeutprøvingen viste at den tidligere anvendte injeksjonsmetoden i egg, injisering i amnionhulen, fortsatt bør benyttes fremfor injisering i luftboblen. Selv om antall undersøkte egg i luftbobleserien var lite, viste resultatene så stor spredning i antall apoptotiske celler i IGL at den metoden ble forkastet (Fig. 12). Egg som ble injisert i amnionhulen med Dexametason 5 mg viste en klar økning i apoptotiske celler i IGL, noe som samsvarer med tidligere undersøkelser ved laboratoriet. Injisering i amnionhulen ble benyttet som injiseringsmetode i resten av eksperimentet.

Initialt i behandlingen av hypotyreose hos gravide brukes levotyrosin i doser på 1,0-2,0 µg/kg/dag (22). Kyllingeggene ble injisert med doser mellom 0,5-2 µg/kg én gang før de ble dekapitert, som er relevante doser i forhold til den kliniske sammenhengen.

Ved undersøkelse av proliferasjonsraten viser kyllingembryoene behandlet med den laveste dose tyrosin samme grad av proliferasjon som kontrollene. Kyllingembryoer behandlet med laveste dose tyrosin viste også lavere apoptoserate enn tyrosin-kontroll. Det kan tyde på at effekten av tyrosin på proliferasjonsraten og apoptoseraten først sees ved høyere konsentrasjoner av tyrosin. Effekten av tyrosin synes å være mest markant på apoptoseraten.

Hos hypertyreotiske kyllingembryoer er det en svak tendens til økt grad av proliferasjon i IGL ved de høyeste dosene med tyrosin (Fig. 13). Både Lauder (1977) og Nicholson og Altman (1972) har vist at det hos hypertyreotiske rotter initialt sees økt grad av celleproliferasjon i EGL (45). Kornceller som migrerer fra EGL til IGL er postmitotiske, og proliferasjonsraten i IGL vil derfor i utgangspunktet være lav. Hypertyreose kan tenkes å påvirke graden av celler i mitose i IGL hos kyllingembryoer via tyreoidhormonenes påvirkning av cellyklus.

Det sees økende grad av apoptose i hypertyreotiske kyllingembryoer behandlet med moderat og høy dose tyrosin i forhold til kyllingegg behandlet med lav dose tyrosin og kontrollene (Fig. 14). Tall fra Lauder (1977) viser økt grad av celledød i EGL hos hypertyreotiske rotter i forhold til hypotyreotiske rotter og kontroller (45). Et redusert antall kornceller i IGL kan medføre redusert produksjon av vekstfaktorer som er nødvendige for at nevronene skal kunne overleve, noe som vil medføre økt grad av apoptose (34). Egne funn av økt grad av apoptose i IGL kan støtte opp under dette, når antall celler migrert fra EGL er redusert.

Ved eksperimentelle forsøk er det alltid muligheter for at det kan skje systematiske feil. I forbindelse med dette eksperimentet kan ulike årsaker til feil skyldes lite erfaring med laboratoriearbeid og teknikker for celletelling. Det er behov for flere eksperimenter for å eventuelt bekrefte at resultatene av økt apoptose og mitose hos hypertyreotiske kyllingembryoer er statistisk signifikante.

Reference List

- (1) Wu XJ, Chen LH, Xu YP. Three case reports of neonatal hyperthyroidism. *Endocrinologist* 2010;20(2):52-4.
- (2) Mistry N, Wass J, Turner MR. When to consider thyroid dysfunction in the neurology clinic. *Pract Neurol* 2009 Jun;9(3):145-56.
- (3) Krassas GE, Poppe K, Glinioer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev* 2010 Oct;31(5):702-55.
- (4) Moore KL, Dalley AF. Clinically oriented anatomy. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- (5) Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology: a cellular and molecular approach. Updated ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders; 2005.
- (6) Sadler TW, Ecker PM, Langman J. Langman's medical embryology. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- (7) Cunningham FG, Williams JW. Williams obstetrics. 23rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
- (8) Krude H, Biebermann H, Krohn HP, Dralle H, Gruters A. Congenital hyperthyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105 Suppl 4:6-11.
- (9) Cunningham FG, Williams JW. Fetal Growth and Development. In: Cunningham FG, Williams JW, editors. Williams obstetrics. 23rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
- (10) Barrett EJ. The Thyroid Gland. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. Medical physiology: a cellular and molecular approach. Updated ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders; 2005. p. 1035-48.
- (11) Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010 Apr;31(2):139-70.
- (12) Anderson GW. Thyroid hormone and cerebellar development. *Cerebellum* 2008;7(1):60-74.
- (13) Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: Clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol* 2004;16(10):809-18.
- (14) Cunningham FG, Williams JW. Maternal Physiology. In: Cunningham FG, Williams JW, editors. Williams obstetrics. 23rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
- (15) Cunningham FG, Williams JW. Thyroid and other endocrine disorders. In: Cunningham FG, Williams JW, editors. Williams obstetrics. 23rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
- (16) Kopp P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* 2001 Aug;58(9):1301-22.

- (17) Woeber KA. Update on the management of hyperthyroidism and hypothyroidism. Arch Intern Med 2000 Apr 24;160(8):1067-71.
- (18) Bjørø T, Holmen J, Krüger Ø, Midthjell K, Hunstad K, Schreiner T, et al. Prevalens av hypotyreose og hypertyreose i Nord-Trøndelag. Tidsskr Nor Lægeforen 2002;122:1022-8.
- (19) Macleod J, Douglas G, Nicol EF, Robertson C. Macleod's clinical examination. 12th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
- (20) Cooper DS. Hyperthyroidism. Lancet 2003 Aug 9;362(9382):459-68.
- (21) Marx H, Amin P, Lazarus JH. Hyperthyroidism and pregnancy. BMJ 2008 Mar 22;336(7645):663-7.
- (22) Casey BM, Leveno KJ. Thyroid disease in pregnancy. Obstet Gynecol 2006 Nov;108(5):1283-92.
- (23) Kumar V, Robbins SL. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
- (24) Hypertyreose hos gravide. Database 2002 January 16 [cited 2010 Sep 29];Available from: URL: <http://legehandboka.no/endokrinologi/hypertyreose-hos-gravid-5729.html>
- (25) Undersøkelse av det nyfødte barn. Norsk elektronisk legehåndbok 2010 March 20 [cited 2010 Nov 21];Available from: URL: <http://legehandboka.no/pediatri/symptomer-og-tegn/nyfodtundersokelsen-14674.html>
- (26) Glinioer D. Thyroid hyperfunction during pregnancy. Thyroid 1998 Sep;8(9):859-64.
- (27) Millar LK, Wing DA, Leung AS, Koonings PP, Montoro MN, Mestman JH. Low birth weight and preeclampsia in pregnancies complicated by hyperthyroidism. Obstet Gynecol 1994 Dec;84(6):946-9.
- (28) Laurberg P, Bornaud C, Karmisholt J, Orgiazzi J. Management of Graves' hyperthyroidism in pregnancy: focus on both maternal and foetal thyroid function, and caution against surgical thyroidectomy in pregnancy. Eur J Endocrinol 2009 Jan;160(1):1-8.
- (29) Hershman JM. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2004 Jun;18(2):249-65.
- (30) Zakarija M, McKenzie JM, Hoffman WH. Prediction and therapy of intrauterine and late-onset neonatal hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1986 Feb;62(2):368-71.
- (31) Kopp P, van SJ, Parma J, Duprez L, Gerber H, Joss E, et al. Brief report: congenital hyperthyroidism caused by a mutation in the thyrotropin-receptor gene. N Engl J Med 1995 Jan 19;332(3):150-4.
- (32) Daneman D, Howard NJ. Neonatal thyrotoxicosis: intellectual impairment and craniosynostosis in later years. J Pediatr 1980 Aug;97(2):257-9.

- (33) Kraniosynostose. Norsk elektronisk legehåndbok 2010 March 20 [cited 2011 Jan 21];Available from: URL: <http://legehandboka.no/pediatri/tilstander-og-sykdommer/ortopedi/kraniosynostose-12560.html>
- (34) Brodal P. Sentralnervesystemet. 4. ed. Oslo: Universitetsforl; 2007.
- (35) Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
- (36) Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. Neuroscientist 2008 Feb;14(1):91-100.
- (37) Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. Brain 1998 Apr;121 (Pt 4):561-79.
- (38) Millen KJ, Gleeson JG. Cerebellar development and disease. Curr Opin Neurobiol 2008 Feb;18(1):12-9.
- (39) Lavezzi AM, Ottaviani G, Terni L, Matturri L. Histological and biological developmental characterization of the human cerebellar cortex. Int J Dev Neurosci 2006 Oct;24(6):365-71.
- (40) Chan S, Kilby MD. Thyroid hormone and central nervous system development. J Endocrinol 2000 Apr;165(1):1-8.
- (41) Ahmed OM, El-Gareib AW, El-Bakry AM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Thyroid hormones states and brain development interactions. Int J Dev Neurosci 2008 Apr;26(2):147-209.
- (42) Aden P, Goverud I, Liestol K, Loberg EM, Paulsen RE, Maehlen J, et al. Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum. Brain Res 2008 Oct 21;1236:39-48.
- (43) Darras VM, Van Herck SL, Geysens S, Reyns GE. Involvement of thyroid hormones in chicken embryonic brain development. Gen Comp Endocrinol 2009 Sep 1;163(1-2):58-62.
- (44) Nicholson JL, Altman J. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. Brain Res 1972 Sep 15;44(1):13-23.
- (45) Lauder JM. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. III. Kinetics of cell proliferation in the external granular layer. Brain Res 1977 Apr 22;126(1):31-51.
- (46) From egg to chick: Development and preservation of embryos. chickscope 2011 January 21 [cited 2011 Jan 21];Available from: URL: http://chickscope.beckman.uiuc.edu/resources/egg_to_chick/development.html